

**Fluoreszenzpolarisation der Komplexe
fluoreszierender tRNA mit
Aminoacyl-tRNA-Synthetase und Ribosomen**

Michael Kahan

—

1976
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Physiologische Chemie und
Physikalische Biochemie der Universität München
Abteilung Prof. Dr. H.G. Zachau

Fluoreszenzpolarisation der Komplexe fluoreszierender tRNA
mit Aminoacyl - tRNA - Synthetase und Ribosomen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwigs Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Michael Kahan
aus Berlin

München 1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Zachau

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.7.1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München in der Zeit von März bis Dezember 1974 ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H.G. Zachau danke ich vielmals für die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. W. Wintermeyer danke ich herzlich für sein ständiges Interesse und für Diskussionen insbesondere der biochemischen Aspekte dieser Arbeit, sowie für die Überlassung der Ethidium-markierten tRNA.

Für die Überlassung der Phe-tRNA-Synthetase danke ich Herrn Dr. R. Hirsch, für die Hilfe und Beratung beim Bau der Apparatur danke ich Herrn Dr. H. Schwab, dem Leiter der Elektronik-Abteilung des SFB 51, sowie Herrn P. Schick, dem Leiter der Werkstatt der Abteilung Zachau.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen der Polarisationsgradmessungen	3
3. Meßanordnung	6
4. Polarisationsgradmessung an Ethidium-markierter tRNA ^{Phe} und ihren Komplexen mit Phe-tRNA-Synthetase und Ribosomen	12
a) Messungen an Ethidium-markierter tRNA ^{Phe}	
b) Titration von tRNA ^{Phe} _{EB 37} und tRNA ^{Phe} _{EB 16/17} mit Phe-tRNA-Synthetase	
c) Untersuchungen zur Ribosomenbindung der Ethidium-markierten tRNA ^{Phe}	
5. Biochemische Materialien und Methoden	22
6. Zusammenfassung	24
7. Literaturverzeichnis	25
8. Abkürzungsverzeichnis	27

1. Einleitung

Fluoreszenz-Untersuchungen sind zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Struktur und Funktion von biologischen Makromolekülen benutzt worden (Übersichten 1, 2). Die Fluoreszenzspektroskopie ist eine besonders geeignete Methode, da sie sehr empfindlich ist und die Substanzen deshalb in geringer Konzentration eingesetzt werden können. Die Verwendung der Fluoreszenzpolarisation bietet sich vor allem an, wenn man die Wechselwirkung eines fluoreszierenden Moleküls mit einem Makromolekül untersucht (3, 4). Voraussetzung zur Anwendung der Fluoreszenzpolarisation ist in jedem Fall, daß eine signifikante Änderung des Molekulargewichts bzw. des Rotationsverhaltens bei der Assoziation bzw. der Dissoziation eintritt.

In mehreren Labors einschließlich dem unseren wurden Fluoreszenzmethoden zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen eingesetzt, und in den meisten Fällen wurden Veränderungen der Fluoreszenzintensität bei der Wechselwirkung studiert (5-8). Auch über erste Versuche zur Ausnutzung der Fluoreszenzpolarisation ist berichtet worden (9). Interessante Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität, Kinetik und Stöchiometrie der tRNA-Synthetase -Wechselwirkungen wurden erhalten. Diese Ergebnisse sind für das Verständnis des Mechanismus der Proteinsynthese wichtig.

In dem Bestreben, eine biologisch aktive, stark fluoreszierende tRNA für Wechselwirkungsstudien nicht nur mit Synthetasen, sondern auch mit Ribosomen zu erhalten, wurden die Y-Base und das Dihydrouracil in tRNA^{Phe} aus Hefe durch fluoreszierende Farbstoffe ersetzt (10-12). Die Fluoreszenzmessungen mit diesen Substanzen sind bisher zum kleineren Teil in unserem Labor, zum größeren Teil in einem Labor in Stockholm ausgeführt worden (9).

Um weitere Fluoreszenzmessungen zu ermöglichen, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein empfindliches und flexibles Gerät zur Messung der Fluoreszenzpolarisation gebaut werden. Dieses Gerät sollte in

einigen vorläufigen Versuchen zur Magnesiumbindung an fluoreszierende tRNAs getestet werden. Es sollte dann in Synthetasebindungsstudien mit tRNA^{Phe}-Molekülen eingesetzt werden, die in der Dihydrouridinschleife bzw. in der Anticodonschleife mit Ethidiumbromid markiert sind (tRNA^{Phe}_{EB 16/17}, tRNA^{Phe}_{EB 37}). Abschließend sollte die Wechselwirkung der beiden fluoreszierenden tRNAs mit Poly U-programmierten Ribosomen studiert werden.

2. Theoretische Grundlagen der Polarisationsgradmessungen

Die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie sind bei Förster und anderen dargestellt (1-4, 13).

In diesem Teil der Dissertation sollen die Definitionen der Meßgrößen und die theoretischen Grundlagen der Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie kurz dargestellt werden.

Bei der Wechselwirkung von Licht mit einem Molekül führt die elektromagnetische Energie der Photonen zur Änderung der elektronischen, rotatorischen und vibratorischen Energiezustände des Moleküls. Kehrt das Molekül über den ersten angeregten elektronischen Singulettzustand unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand zurück, so spricht man von Fluoreszenz.

Das Fluoreszenzlicht hat einen anderen Polarisationsgrad als das anregende Licht. Der Polarisationsgrad ist durch den Quotienten aus der Differenz zur Summe der Intensitätskomponenten des Lichtes vertikal ($I_{\parallel}$) und horizontal ($I_{\perp}$), relativ zum Beobachter definiert:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Änderungen des Polarisationsgrades lassen sich auf der Grundlage des Dipolmodells des Moleküls erklären, bei dem ein Dipol mit fester Orientierung in einem Molekül die Absorption und ein weiterer Dipol die Emission des Lichtes vermittelt.

Eine erste Ursache für die Depolarisation des anregenden Lichts liegt bereits im Absorptionsvorgang. Linear polarisiertes Licht regt aus einer Population statistisch verteilter Dipole bevorzugt die parallel zu seiner Schwingungsrichtung orientierten Dipole an. Ist α der Winkel zwischen dem elektrischen Feldstärkevektor und dem Dipol, so wird die Feldstärkekomponente den Dipol proportional zu $\cos \alpha$ anregen. Da die Intensität aus dem Quadrat der Feldstärkekomponenten gebildet wird, ist die Wahrscheinlichkeit für die Absorption proportional zu $\cos^2 \alpha$.

Ein weiterer Grund für die Depolarisation ist die Drehung des elektrischen Feldstärkevektors um den Winkel β zwischen Absorptions- und

Emissionsdipol. Der für ruhende Moleküle maximal erreichbare Polarisationsgrad, die Grenzpolarisierung, hängt von der Größe dieses Winkels ab. Aus rein trigonometrischen Gleichungen für die vertikalen und horizontalen Intensitäten läßt sich eine Beziehung zwischen dem Polarisationsgrad und dem Mittelwert des Winkels für alle Dipole finden (3, 4). Zur Berechnung des Mittelwertes muß für die Absorption der obengenannte $\cos^2 \alpha$ und zusätzlich für die Emission $\sin \beta$ als Gewichtungsfaktor berücksichtigt werden, da die Zahl der Emissionsdipole proportional zu $\sin \beta$, d.h. proportional zur Oberfläche des Kegelmantels eines Kegels mit dem Öffnungswinkel β ist. Der Polarisationsgrad kann daher nicht kleiner als $-1/3$ und nicht größer als $1/2$ sein (3).

Eine dritte Ursache der Polarisationsgradänderung des emittierten relativ zum eingestrahltten Licht ergibt sich aus der Brownschen Molekularrotation (13, 14). Durch Rotation des angeregten Moleküls dreht sich der Emissionsdipol relativ zur ursprünglichen Lage des Dipols vor der Emission des Fluoreszenzlichtes. Aus der Größe der Depolarisation lassen sich bei bekannter Grenzpolarisierung p_0 und Fluoreszenzüberlebenszeit Rückschlüsse auf die Rotationsrelaxationszeit des fluoreszierenden Moleküls ziehen. Der Zusammenhang zwischen dem Polarisationsgrad p und den genannten Größen wird für starre, kugelsymmetrische Moleküle durch die Perringleichung beschrieben (15-17),

$$\left(\frac{1}{p} - \frac{1}{3} \right) = \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{\tau}{\vartheta} \right)$$

die in dieser Form für die Anregung mit linear polarisiertem Licht gilt. Die Relaxationszeit der Rotation ϑ hängt vom Molekülvolumen V , der Viskosität η des Lösungsmittels und der Temperatur T ab,

$$\vartheta = \frac{\eta V}{R T}$$

R ist die allgemeine Gaskonstante.

Demnach führt eine Vergrößerung des Molekülvolumens bei sonst gleichbleibenden Bedingungen zu einem höheren Polarisationsgrad.

Im Extremfall sehr großer Moleküle oder sehr großer Viskosität wird sich der gemessene Polarisationsgrad der Grenzpolarisierung nähern.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen lassen sich Assoziationen fluoreszierender Moleküle an Makromoleküle durch Messung des Polarisationsgrades der Fluoreszenz verfolgen. Die Messung ist am empfindlichsten, wenn die Überlebenszeit und die Rotationsrelaxationszeit vergleichbar groß sind. Wie die Perringleichung zeigt, ist eine Zunahme des Polarisationsgrades nur dann direkt als Zunahme des Molekülvolumens zu deuten, wenn sich die Überlebenszeit während des Experiments nicht ändert. Bei allen derartigen Messungen muß die Überlebenszeit deshalb kontrolliert werden. Das kann durch direkte Messung, die sehr aufwendig ist, oder einfacher durch Beobachtung der Fluoreszenzintensität geschehen. Eine Änderung der Quantenausbeute ist im Fall der Fluoreszenzlöschung durch Stöße zweiter Art direkt proportional der Änderung der Überlebenszeit: $\eta_1 / \eta_2 = \tau_1 / \tau_2$.

Für das Rotationsverhalten einer fluoreszierenden Gruppe, die an ein Makromolekül gebunden ist, wurden die oben geschilderten Zusammenhänge über die Perringleichung hinaus weiterentwickelt (3, 18). Die Annahme eines starren, kugelsymmetrischen Rotators trifft dann nicht mehr zu. Die beobachtete Beweglichkeit einer fluoreszierenden Gruppe an einem Makromolekül setzt sich im allgemeinen zusammen aus einer Rotation des Makromoleküls, der Flexibilität des Makromoleküls in der Umgebung der fluoreszierenden Gruppe und der Rotation der fluoreszierenden Gruppe selbst. Die beobachtete Rotationsrelaxationszeit ist eine Überlagerung der Relaxationszeiten dieser Prozesse.

Damit ist die direkte Interpretation von Polarisationsgradmessungen erschwert. Andererseits kann man erwarten, in günstigen Fällen durch Messungen bei verschiedenen Bedingungen eine Information über die Beweglichkeit verschiedener Bereiche des Makromoleküls zu erhalten.

3. Meßanordnung

Zur Messung der Fluoreszenzpolarisation wurde eine im Prinzip schon von Perrin (15), Weber (3), Czerlinski (19), sowie von Rigler, Jovin und Rabl (20) beschriebene Apparatur gebaut, die für das Meßproblem tRNA-Synthetase- und tRNA-Ribosomen-Wechselwirkung adaptiert war.

Das wesentliche Merkmal dieser Anordnung war die gleichzeitige Messung der horizontal und vertikal polarisierten Komponenten des emittierten Lichtes mit zwei exakt abgeglichenen Photomultipliern, um durch Eliminierung der Schwankungen der Lichtquelle die zur Messung kleiner Effekte erforderliche Genauigkeit zu erreichen. Die Meßsignale wurden in einem Analogrechner direkt zu den Funktionen des Polarisationsgrades oder der Anisotropie verarbeitet.

Optisches System

Das optische System (Abb. 1) zur Beleuchtung der Küvette bestand auf der Excitationsseite aus einer Höchstdrucklampe (HBO 200 W oder XBO 150 W/4, Fa. Osram, Berlin) in einem Lampengehäuse mit justierbarer Halterung und Quarzoptik, dem Monochromator mit variablen Spalten (Öffnungsverhältnis 1:3,5, Dispersion 6,4 nm/mm 0,1% Streulicht, Fa. Bausch und Lomb, Rochester, USA), der Polarisationsfolie (Polarex W44, Fa. Käsemann, Oberaudorf) und der bikonvexen Quarzlinse (5 cm Brennweite, Fa. Schott und Gen., Mainz).

Die Fluoreszenzemission wurde im rechten Winkel zur Anregungsrichtung mit den sich in einer Linie gegenüberstehenden hochempfindlichen Photomultipliern (9824 A, Fa. EMI, Middlesex, England) ohne weitere Linsen durch Polarisationsfolien (Polarex W44, Fa. Käsemann, Oberaudorf) und Kantenfilter (Fa. Schott und Gen., Mainz) gemessen. Das Lösungsverhältnis war für sichtbares Licht besser als 1:5000.

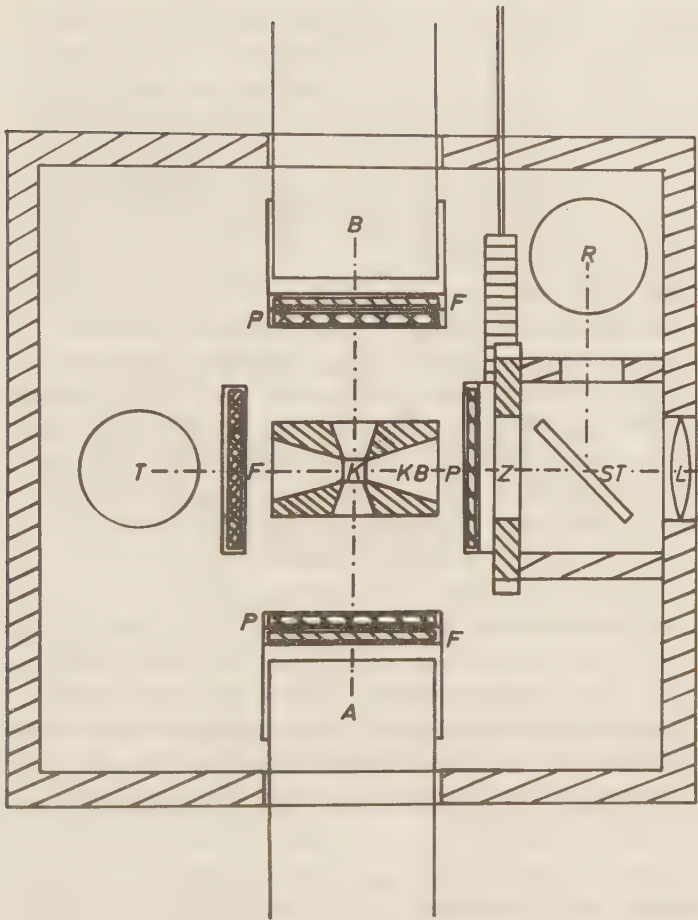


Abb. 1: Optischer Aufbau und Küvettengehäuse des Polarisations-spektrophotometers

Optische Achsen -.-., Quarzlinse L, Strahlenteiler ST, Zahnrad-Zahnstangensteuerung Z, Polarisationsfolie P, Küvettenblock KB, Küvette K, Filter F, Photomultiplier A, B, R, T.

Zur Änderung der Apparatur dienten auswechselbare Blenden; außerdem konnte der Abstand der Photomultiplier zur Küvette variiert werden. Eine Quarzplatte vor der Polarisationsfolie reflektierte einen kleinen Anteil des einfallenden Lichtes auf den Referenzphotomultiplier R (1P 28, RCA). Der durchgelassene Anteil war auf die Küvettenmitte fokussiert. Für Transmissionsmessungen war der Multiplier T (1P 28, RCA) und eine weitere Filterhalterung vorgesehen.

Elektrischer Schaltkreis

Die Eingangsstufe bewirkte für alle Photomultipliersignale eine Strom-Spannungswandlung. Der elektrische Schaltkreis (Abb. 2) zur Funktionsbildung enthielt neben den auch sonst üblichen Operationsverstärkern (301 A, Fa. Analog Devices, München) noch einen Analog Dividierbaustein (426 L mit 0,25% Genauigkeit, Fa. Analog Devices, München) zur gleichzeitigen Vorbereitung der Photomultipliersignale A und B zum Polarisationsgrad $(A-B)/(A+B)$ und zur Anisotropie $(A-B)/(A+2B)$. Metallfilmwiderstände von 0,1% Genauigkeit garantierten die Linearität aller Bauelemente und ließen die Messung von A und B mit einer Genauigkeit von 0,1% zu. Die Genauigkeit des Polarisationsgrades $(A-B)/(A+B)$ erreichte damit etwa 1% vom Endwert. Eine Übersteuerungsanzeige für die Eingangsgröße und die Fluoreszenzintensität $A+2B$ ließen erkennen, wann eine Größe außerhalb des Linearitätsbereichs der elektronischen Bauelemente fiel. Alle Signale, die A-B enthielten, konnten mit einem Faktor 1, 2, 5 oder 10 versehen werden.

Referenzsignal R und Transmissionssignal T wurden ebenso wie alle anderen Signale über einen Wahlschalter mit den Stellungen O, A, B, R, T, A-B, A+B, A+2B, $(A-B)/(A+B)$, $(A-B)/(A+2B)$ auf den Ausgang für den Schreiber gegeben und gleichzeitig von einem vierstelligen Digitalanzeigegerät mit zusätzlichem Schalter für den Meßbereich dargestellt.

Das Ausgangssignal konnte durch ein RC-Glied mit den wahlweise einstellbaren Zeitkonstanten von 0,2, 1 oder 5 sec gefiltert werden.

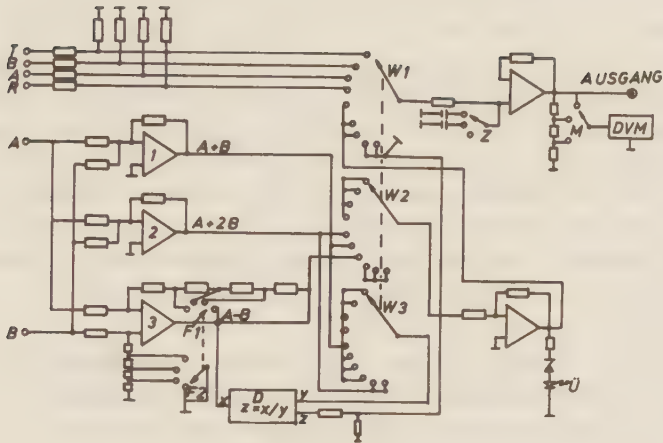


Abb. 2: Elektrischer Schaltkreis zur Funktionsbildung der Eingangssignale des Polarisationspektrophotometers

Eingangssignale A, B, R, T; Stufen zur Funktionsbildung von $A-B$, 1, von $A+2B$, 2, und von $A-B$, 3; Faktorschalter für $A-B$ mit zwei Ebenen F1 und F2; Wahlschalter für T, B, A, R, $A+2B$, $A+B$, $A-B$, $(A-B)/(A+B)$, $(A-B)/A+2B$ und 0 mit drei Ebenen W1, W2 und W3; Dividier-Analogrechner D; Überlaufanzeige für $A+2B$; Zeitkonstantenschalter Z und Digitalvoltmeter DVM mit Meßbereichschalter M.

Mechanischer Aufbau

Die Meßapparatur war auf einer Aluminiumplatte fest aufgebaut. Das Lampengehäuse und der Monochromator waren auf einer Dreikant-schiene verschiebbar. Das Küvettengehäuse (Abb. 1, 21cm x 21cm x 13cm) war fest auf der Grundplatte verschraubt und durch einen Gummibalg vor der justierbaren Eintrittslinse mit dem Monochromator verbunden. Es enthielt den temperierbaren Küvettenblock für quadratische Quarzküvetten (Innenmaße 5mm x 5mm x 24mm, Außenmaße 7mm x 7mm x 25mm, Fa. Hellma, München). Der Block hatte nach allen vier Seiten konische Aussparungen für den Lichtdurchtritt. Die Apertur der Aussparungen für das Fluoreszenzlicht konnte durch ein Paar Lochblenden variiert werden. Vor dem Eintrittsfenster des Blockes war die mit einer Zahnrad-Zahnstangenführung um 90° auf Anschlag von außen drehbare Polarisationsfolie angebracht.

Der Abstand der Photomultiplier A und B mit den aufgesteckten Vorsätzen für Polarisationsfolie und Kantenfilter vom Küvettenblock konnte durch eine von außen justierbare Führung variiert werden.

Der Deckelverschluß war mit Nut- und Federpassung gegen Lichteinfall versehen. Der Deckel trug in der Mitte eine Vorrichtung zur Aufnahme einer Mikroliterspritze (Fa. Micromesure, Holland). Deren Kanüle tauchte mit einem aufgesteckten Teflonscheibchen in die Flüssigkeit ein, ohne das Lichtbündel zu erreichen und diente samt Rückholfeder für die Spritze als Mischvorrichtung.

Meßvorgang

Die Messung begann mit der Dunkelstromkompensation der Photomultiplier. Danach wurde die Verstärkung des Meßsignals durch Wahl der Hochspannung für die Photomultiplier und der Eingangsverstärkung in den Bereich der größten Meßgenauigkeit (2 Volt) der Elektronikbausteine für die Funktionsausbildung, insbesondere den Dividierer, gebracht. Die Filterhalter wurden so justiert, daß die Durchlaßrichtung der Analysatorfolien senkrecht zueinander und in einem Fall parallel, im anderen Fall senkrecht zu der der Polarisatorfolie lagen.

Die Einstellung der Photomultiplier auf gleiche Empfindlichkeit wurde bei gleicher Stellung beider Analysatoren relativ zum Polarisator vorgenommen. Technisch wurde diese Stellung durch eine von außen gesteuerte Drehung des Polarisator um 90° durchgeführt. Damit war die Polarisationsrichtung beider Analysatoren senkrecht zu der des Polarisators.

Diese Art des Abgleichs war gleichzeitig eine Korrektur für die Depolarisation des Systems. Zur Meßstellung wurde der Polarisator wieder um 90° zurückgedreht.

4. Polarisationsgradmessungen an Ethidium-markierter tRNA^{Phe}
und ihren Komplexen mit Phenylalanyl-tRNA-Synthetase und
Ribosomen

Als Vorarbeit für spätere Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Dissertation folgende Fragen untersucht:

- a) Reicht die Genauigkeit der Meßanordnung aus, um noch kleine Unterschiede im Polarisationsgrad zu messen?
- b) Lassen sich Bereiche des tRNA-Moleküls bestimmen, die direkt an der Bindung von Aminoacyl-tRNA-Synthetase beteiligt sind?
Dazu sollten tRNA^{Phe}_{EB} benutzt werden, die Fluoreszenzmarkierungen an verschiedenen Positionen tragen.
- c) Ist die Bindung der tRNA^{Phe}_{EB} an Ribosomen ebenso zu messen wie die Bindung an Synthetase?

zu a) Messungen an Ethidium-markierter tRNA^{Phe}

Das Polarisationsanregungsspektrum der tRNA^{Phe}_{EB} 37 zeigte ebenso wie freies Ethidiumbromid in der sichtbaren Absorptionsbande einen positiven Polarisationsgrad, während bei Anregung im ultravioletten Bereich ein geringfügig negativer Polarisationsgrad beobachtet wurde. Alle folgenden Messungen wurden deshalb im sichtbaren Bereich des Spektrums ausgeführt. Zur Anregung wurde das Licht der grünen Quecksilberline (546nm) verwendet.

Zur Verminderung des Streulichtanteils von ca. 0,1% wurde zusätzlich ein Interferenzfilter (546nm, Fa. Oriel, Darmstadt) hinter den Monochromator gesetzt. Die Fluoreszenzmission wurde durch Kantenfilter (OG 590, Fa. Schott und Gen., Mainz), die eine ausreichende Unterdrückung des gestreuten anregenden Lichts gewährleisten, gemessen. Mit dieser Meßanordnung und kleinen Aperturen war die Fluoreszenzpolarisation der tRNA^{Phe}_{EB} noch in Konzentrationen von 10^{-8} M zu messen.

In ersten Versuchen wurde tRNA^{Phe}_{EB 37} und tRNA^{Phe}_{EB 16/17} mit Magnesiumionen titriert. Daraus sollten Aussagen über die Genauigkeit des Apparates sowie über den Sättigungsbereich bezüglich der Magnesiumkonzentration für weitere Untersuchungen gefunden werden. Aus dem Ausmaß der Änderungen sollte der Einfluß interner Flexibilitätsänderungen des tRNA-Moleküls, die durch den Zusatz der Magnesiumionen bewirkt werden, auf den Polarisationsgrad des Gesamtmoleküls abgeschätzt werden.

Es zeigte sich, daß Polarisationsgradunterschiede von 0,002 gemessen werden konnten. Der Polarisationsgrad stieg bei Zugabe von Magnesiumionen in beiden Fällen an. Die Zunahme des Polarisationsgrades war von einer Abnahme der Fluoreszenzintensität begleitet.

Die beim Zusatz von Magnesiumionen zu magnesiumfreier tRNA^{Phe} eintretenden Struktureffekte (21) ließen sich demnach mit den beiden Parametern Fluoreszenzpolarisation und Intensität nachweisen. Zur näheren Interpretation dieser Effekt sind jedoch eingehendere Messungen, insbesondere Messungen der Überlebenszeit, erforderlich. Für den hier verfolgten Zweck war zunächst der Befund ausreichend, daß von einer Magnesiumkonzentration von etwa 5 mM ab keine wesentlichen Änderungen der beiden gemessenen Parameter mehr beobachtet wurden. Bei den im folgenden beschriebenen Messungen der Bindung von Ethidium-markierter tRNA^{Phe} an Phe-tRNA-Synthetase und an Ribosomen wurden daher Puffer mit 5 mM bzw. 20 mM Magnesium verwendet.

zu b) Tritration von $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{EB 16/17}}^{\text{Phe}}$ mit $\text{Phe-tRNA-Synthetase}$

Die Untersuchung der Bindung von $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ an Phenylalanyl-tRNA-Synthetase durch Messung der Fluoreszenzpolarisation wurde bereits ausführlich beschrieben (9). Eigene Untersuchungen mit der neu erstellten Apparatur konnten dieses Experiment mit dem gleichen Ergebnis bezüglich der Größe der Bindungskonstanten und der Zahl der Bindungsstellen bestätigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden analoge Versuche mit $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{EB 16/17}}^{\text{Phe}}$ durchgeführt. Die Komplexbildung zwischen tRNA und Phe-tRNA-Synthetase wurde anhand der Immobilisierung der tRNA im Komplex verfolgt. Experimentell wurde der Polarisationsgrad der fluoreszierenden tRNA, deren Konzentration konstant gehalten wurde, in Abhängigkeit von der zugesetzten Synthetase menge gemessen. Außerdem wurde die Fluoreszenzintensität gemessen. Abbildung 3a zeigt das Ergebnis eines solchen Experiments für $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$. Der Polarisationsgrad nahm bei der Bindung an die Synthetase um 0,10 zu, während die Intensität um etwa 15% abnahm. Die Auswertung der durch den Polarisationsgrad gemessenen Bindungskurve nach dem Verfahren von Scatchard (22) ergab eine Bindungskonstante von $4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, die Zahl der je Synthetase moleköl gebundenen tRNA-Moleküle war etwa eins. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den publizierten Daten für $\text{tRNA}_{\text{EB 37 red}}^{\text{Phe}}$ (9).

Der gleiche Versuch mit $\text{tRNA}_{\text{EB 16/17}}^{\text{Phe}}$, Abbildung 3b, brachte im wesentlichen das gleiche Ergebnis; ein geringer Unterschied in der Bindungskonstanten, $1,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, wurde beobachtet. Die Zunahme des Polarisationsgrades betrug ebenfalls etwa 0,1, die Fluoreszenzintensität blieb unverändert. Die größere Zunahme des Polarisationsgrades der $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ gegenüber der $\text{tRNA}_{\text{EB 16/17}}^{\text{Phe}}$ mußte im Zusammenhang mit der beobachteten Abnahme der Fluoreszenzintensität der $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ und damit der Überlebenszeit gesehen werden.

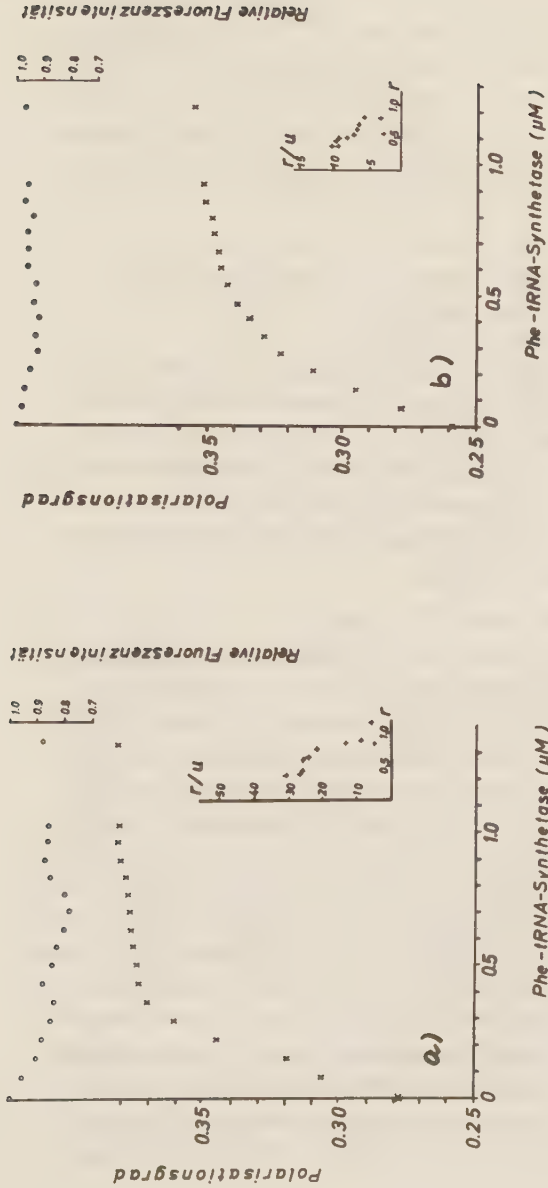


Abb. 3: Titration der tRNA^{Phe}_{EB 37} und der tRNA^{Phe}_{EB 16/17} mit

Phe-tRNA-Synthetase in Phosphatpuffer

- x Polarisationsgrad
- o relative Fluoreszenzintensität
- + Bindungskurve in der Auftragung nach Scatchard (22);
- u = Mol ungebundener tRNA, r = Mol gebundener tRNA/Mol Synthetase; Konzentrationen in μM .
- Die vorgelegte tRNA-Konzentration war 0,3 μM .

Durch eine entsprechende Korrektur des beobachteten Endwertes des Polarisationsgrades anhand der Perringleichung erhält man für die Titration der $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ eine um etwa 10% geringere Änderung des Polarisationsgrades durch Immobilisierung des Farbstoffs bei der Bindung verglichen mit der $\text{tRNA}_{\text{EB 16/17}}^{\text{Phe}}$. Aus diesem Befund ergab sich ein Hinweis auf eine direkte Beteiligung der Dihydrouridinschleife bei der Bindung der tRNA^{Phe} an die $\text{Phe-tRNA}^{\text{Phe}}$ -Synthetase.

Zu c) Messung der Ribosomenbindung der unbeladenen und beladenen $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ und $\text{tRNA}_{\text{EB 16/17}}^{\text{Phe}}$

In grundsätzlich gleicher Weise wie die Messung der Synthetasebindung sollte auch die tRNA-Bindung an Ribosomen zu untersuchen sein. Wegen ihres hohen Partikelgewichts (etwa $2,6 \times 10^6$ Dalton für 70S Ribosomen (23)) sollte die Bindung Ethidium-markierter tRNA an Ribosomen zu einer wesentlich größeren Zunahme des Polarisationsgrades führen als die Bindung an die Phe-tRNA-Synthetase (Molekulargewicht $2,5 \times 10^5$ Dalton).

Für die im folgenden beschriebenen Bindungsversuche wurden Ribosomen von *E. coli* B verwendet, da sie mit guter Aktivität herzustellen und stabil sind (zur Herstellung s. Kap. 5). Abbildung 4a zeigt die Titrationskurven für die Komplexbildung der $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ mit Ribosomen in Gegenwart und in Abwesenheit von Poly U. Wiederum wurde der Polarisationsgrad und die Intensität der Fluoreszenz bei gleichbleibender Konzentration der vorgelegten $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ in Abhängigkeit von der zugesetzten Ribosomenmenge gemessen. Bei den ersten Punkten der Titration in Gegenwart von Poly U wurde direkt nach der Zugabe der Ribosomen ein stark erhöhter Polarisationsgrad gemessen. Die Einstellung des jeweiligen Endwertes wurde dann in Intervallen von 5 Minuten gemessen und dauerte bis zu 20 Minuten. Bei diesem langsamen Prozeß erfolgte eine weitere Zunahme des Polarisationsgrades um etwa 25% des Endwertes. Die starke Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der Bindung lieferte die gleiche Bindungskurve wie die Messung des Polarisationsgrades. Auch in Abwesenheit von Poly U wurde eine Bindung der tRNA an die Ribosomen

beobachtet. Hier zeigte sich kein langsamer Bindungsschritt. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität lieferte auch in diesem Fall eine äquivalente Bindungskurve. Der Endwert des Polarisationsgrades lag wesentlich unter dem in Gegenwart von Poly U gemessenen.

Bei analogen Versuchen mit $\text{tRNA}_{\text{EB 16/17}}^{\text{Phe}}$ wurden qualitativ die gleichen Effekte beobachtet, Abbildung 4b. Die Amplitude des langsamen Prozesses bei der Bindung in Gegenwart von Poly U war jedoch wesentlich kleiner und machte nur noch etwa 3-5% der ebenfalls geringeren Gesamtamplitude aus. Dagegen war die Zunahme des Polarisationsgrades bei der Bindung in Abwesenheit von Poly U ähnlich der mit $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ beobachteten. Berücksichtigte man die unterschiedliche Intensitätszunahme, so läßt sich aus dem Ergebnis ableiten, daß die Immobilisierung der fluoreszierenden Gruppe im Komplex wesentlich davon abhängig war, daß sie sich in der Anticodon- und nicht in der Dihydrouridinschleife befand. Im Fall der Anticodonmarkierung bewirkte offenbar die Bindung in Gegenwart von Poly U eine starke Immobilisierung des Farbstoffs, bei unspezifischer Bindung in Abwesenheit von Poly U war die Immobilisierung der Farbstoffe dagegen für beide tRNA gleich.

Als nächster Schritt wurde die von der biologischen Funktion her sinnvollere Ribosomenbindung aminoacylierter tRNA untersucht. Unter den Bedingungen des Ribosomenbindungstests (pH 7,2) war Aminoacyl-tRNA nicht stabil. Es wurde nun versucht, durch Zugabe von (^{14}C)-Phenylalanin, ATP und Phe-tRNA-Synthetase in katalytischer Menge in der Meßküvette ein Gleichgewicht mit einem konstanten, hohen Anteil an aminoacylierter $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ herzustellen. Das Ausmaß der Aminoacylierung wurde kontrolliert durch Bestimmung der mit kalter Trichloressigsäure fällbaren Radioaktivität in aliquoten Teilen des Ansatzes, die zu jedem Meßpunkt entnommen wurden.

Die Aminoacylierung führte im Fall der $\text{tRNA}_{\text{EB 37}}^{\text{Phe}}$ zu einer deutlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität um 10-20%, begleitet von einer geringen Abnahme des Polarisationsgrades. Dieser Effekt wurde hier nicht weiter verfolgt.

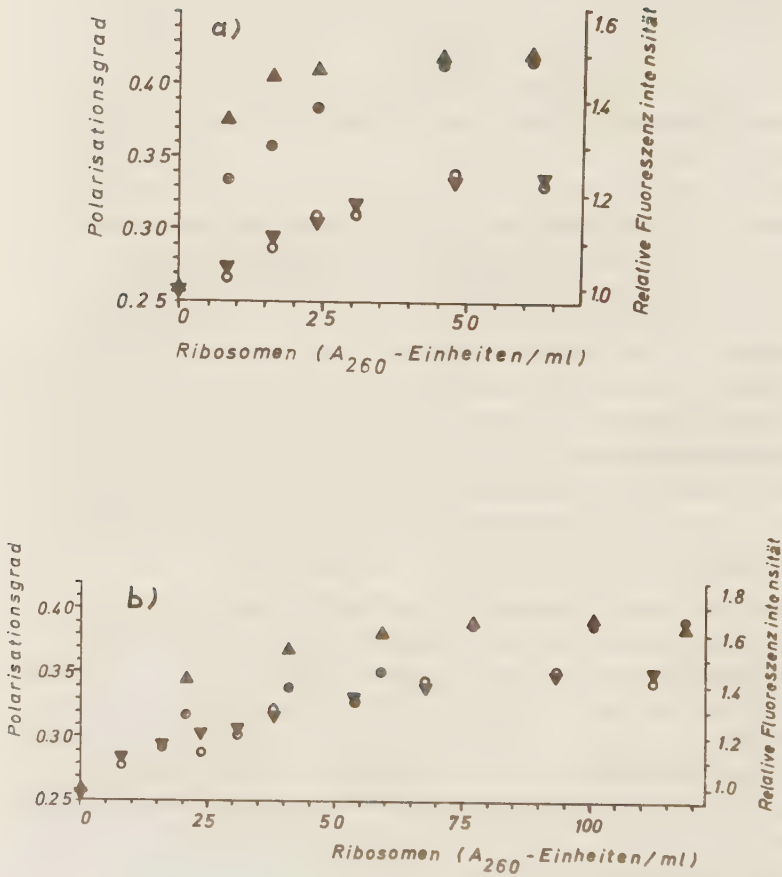


Abb. 4: Titration der tRNA^{Phe}_{EB 37} (a) und der tRNA^{Phe}_{EB 16/17'} (b) mit E.coli B Ribosomen in Bundungspuffer

- ▲ Polarisationsgrad in Gegenwart von 7 A_{260} -Einheiten/ml Poly U, und
- ▼ ohne Poly U;
- relative Fluoreszenzintensität, mit Poly U, und
- ohne Poly U.

Die vorgelegte tRNA-Konzentration war 0,3 μ M.

Bei den Vorversuchen hatte sich gezeigt, daß zugesetztes Poly U nicht nur, wie schon früher beschrieben (24), die Aminoacylierung stark hemmt, sondern daß es auch, wahrscheinlich durch die Aminoacylierungshemmung, eine rasche Deacylierung schon aminoacylierter tRNA bewirkte. Beim Zusatz von Ribosomen wurde dieser Effekt rückgängig gemacht. Um diese Komplikation zu umgehen, wurde in den folgenden Experimenten Poly U erst nach der ersten Zugabe der Ribosomen zugesetzt. Mit dieser Technik gelang es, über zwei Stunden eine etwa konstante Menge Aminoacyl-tRNA zu halten, auch in Gegenwart von Ribosomen. Bei längeren Meßzeiten war der Abfall der Beladung jedoch immer noch beträchtlich.

Zu jedem Meßpunkt wurde die Menge der an Ribosomen gebundenen ^{14}C -Phe-tRNA nach dem von Nirenberg und Leder (25) angegebenen Verfahren durch Adsorption des Komplexes an Membranfilter und Messung der Radioaktivität bestimmt. Zur Vermeidung der Adsorption des in großem Überschuß zugesetzten ^{14}C -Phenylalanins mußten die Filter mit nicht radioaktivem Phenylalanin vorbehandelt werden.

Abbildung 5 zeigt die Ergebnisse der Titration der aminoacylierten tRNA^{Phe}_{EB 16/17} mit Ribosomen in Gegenwart und Abwesenheit von Poly U. Alle vier durch Messung des Polarisationsgrades erhaltenen Bindungskurven waren identisch mit denen der nicht aminoacylierten tRNA (vgl. Abb. 4). Dasselbe gilt für den Verlauf der Fluoreszenzintensität, der nicht eingezeichnet ist. Der Befund, daß aminoacylierte und nicht aminoacylierte tRNA in gleicher Weise an E. coli Ribosomen binden, war im Einklang mit früheren Berichten in der Literatur (z. B. 26). Der Membranfiltertest lieferte vergleichbare Ergebnisse im Fall der Komplexbildung in Gegenwart von Poly U. Bei den Versuchen ohne Poly U dagegen zeigte sich die höhere Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessung, die auch die Bildung der weniger stabilen, unspezifischen Komplexe anzeigt (27).

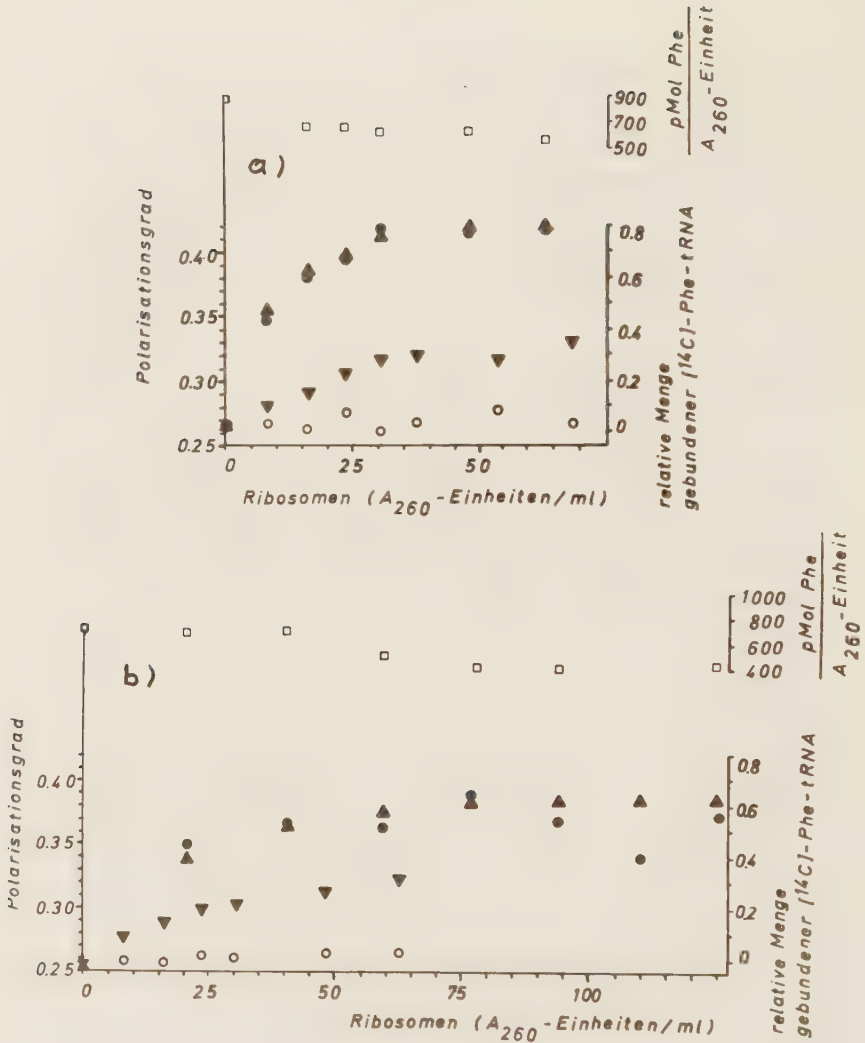


Abb. 5: Titration der ^{14}C -Phe-tRNA $^{\text{Phe}}$ EB 37 (a) und der ^{14}C -Phe-tRNA $^{\text{Phe}}$ EB 16/17 (b) mit E.coli B Ribosomen in Bindungspuffer

- ▲ Polarisationsgrad in Gegenwart von 7 A_{260} -Einheiten/ml Poly U, und
- ▼ ohne Poly U;
- relative Menge gebundener ^{14}C -Phe-tRNA mit Poly U, und
- ohne Poly U;
- pMol Phe / A_{260} -Einheit

Die vorgelegte tRNA-Konzentration war 0,3 μM .

Die beschriebenen Experimente haben gezeigt, daß die Messung der Fluoreszenzpolarisation grundsätzlich zur Verfolgung der Bindung von tRNA an Ribosomen geeignet ist. Die direkte Beobachtung der Reaktion gab insbesondere die Möglichkeit, die bei der tRNA-Bindung an Ribosomen stattfindenden Vorgänge auch kinetisch zu verfolgen. Dabei zeigte sich, daß bei der Bindung der tRNA an Ribosomen zwei Schritte unterschieden werden können. Zunächst erfolgte eine schnelle Assoziation, die Poly U unabhängig war, und unabhängig von der Markierungsstelle an der tRNA zur gleichen Immobilisierung der Farbstoffe führt. Die spezifische Poly U abhängige Bindung erfolgte danach in einem sehr langsamen Prozeß und führte zu einer relativ stärkeren Festlegung des Farbstoffs in der Anticodonschleife wie es auf Grund der Wechselwirkung des Anticodons der tRNA mit dem Codon des Poly U zu erwarten war.

5. Biochemische Materialien und Methoden

tRNA^{Phe} wurde aus Brauereihefe (Fa. Boehringer, Mannheim) von W. Wintermeyer isoliert. Zur Berechnung der tRNA-Konzentration aus der Extinktion bei 260 nm wurde der Extinktionskoeffizient $\epsilon_{260} = 6,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet. tRNA^{Phe}_{EB 37} und tRNA^{Phe}_{EB 16/17} waren von W. Wintermeyer hergestellt. Die Aminosäureakzeptoraktivität lag bei 1100-1400 pMol Phe / A₂₆₀-Einheit.

Phe-tRNA-Synthetase aus Bäckerhefe mit einer spezifischen Aktivität von 2,16 E/A₂₈₀-Einheit war von R. Hirsch hergestellt (Chargennummer 1881). Für die Molaritätsberechnung wurde ein Molekulargewicht von $2,5 \times 10^5$ und ein Wert von 1,12 mg / A₂₈₀-Einheit eingesetzt.

E. coli B Ribosomen wurden nach der allgemeinen Methode von Nirenberg (28) durch wiederholte Zentrifugation bei $10^5 g$ und Wiederauflösen in Standardpuffer (10 mM Tris, 10 mM Magnesiumacetat, 60 mM Kaliumchlorid und 6 mM Mercaptoäthanol, pH 7,2) isoliert. Abweichend wurde zwischendurch zweimal mit Standardpuffer, der zusätzlich 3 M Kaliumchlorid enthielt, gewaschen.

Titrationen

Alle Titrationen wurden bei gleichbleibender Konzentration aller Substanzen mit Ausnahme der jeweils veriierten Substanz bei 24°C durchgeführt.

Die Titrationen mit Synthetase wurden im Phosphatpuffer (30 mM Kaliumphosphat, 5 mM Magnesiumchlorid, 0,5 mM EDTA, 1 mM Gluthathion und 10% Glycerin, pH 7,2) vorgenommen.

Radioaktivitätsmessung

¹⁴C-Phe mit der spezifischen Radioaktivität von 522 Ci/Mol stammte vom Radiochemical Centre, Amersham, Holland. Radioaktivität wurde auf Filter nach Trocknung bei 80°C während 20 Minuten mit Toluolszintillator (4 g Omnifluore in 1 l Toluol) gemessen. Milliporefilter waren mit Bindungspuffer vorgewaschen, der zusätzlich 1 mM Phe

enthielt.

Apparative Hilfsmittel

Fluoreszenzspektren wurden im Spektralfluorimeter (MPF-2A der Fa. Perkin-Elmer), Absorption im Photometer (Zeiss PMQ II) und Radioaktivität im Szintillationszähler (Tri-Carb 331 der Fa. Packard Instr.) gemessen.

6. Zusammenfassung

Die Erstellung einer Apparatur zur genauen und empfindlichen Messung der Fluoreszenzintensität und der Fluoreszenzpolarisation wird beschrieben. Die hohe Genauigkeit wird wesentlich erreicht durch die gleichzeitige Messung der vertikal und horizontal polarisierten Komponenten des emittierten Lichtes und durch die elektronische Auswertung mit Hilfe eines Analogmultiplizierers.

Mit diesem Gerät wurde die Wechselwirkung von tRNA^{Phe}, die in der Anticodonschleife (Position 37) oder in der Dihydrouridinschleife (Position 16/17) mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid markiert war, mit Phe-tRNA-Synthetase und mit Ribosomen gemessen.

Die Polarisationsgradmessungen an den Komplexen verschieden markierter tRNA^{Phe} mit Phe-tRNA-Synthetase zeigten eine stärkere Immobilisierung des Farbstoffs in der Dihydrouridinschleife. Der Befund deutete auf eine direkte Beteiligung dieses Bereiches des tRNA-Moleküls an der Komplexbildung hin.

Analog wurde die Komplexbildung der beiden verschieden markierten tRNA mit E. coli Ribosomen untersucht. Dabei zeigte sich bei der Bindung an den Ribosom-Poly U-Komplex eine wesentlich stärkere Immobilisierung der Farbstoffe als bei der Bindung an Synthetase. Die Immobilisierung des Farbstoffs in der Anticodonschleife war stärker als in der Dihydrouridinschleife. Die unspezifische Bindung in Abwesenheit von Poly U führte in beiden Fällen zu Komplexen mit höherer Beweglichkeit der Farbstoffe, unabhängig von der Position der Markierung. Die spezifische Bindung der tRNA erfolgte in zwei Schritten mit verschiedener Geschwindigkeit: einem schnellen, unspezifischen Bindungsschritt, der unabhängig von Poly U war, folgte ein sehr langsamer Schritt, der nur in Gegenwart von Poly U beobachtet wurde und zur Festlegung der Anticodonschleife im Komplex führte.

Die grundsätzliche Eignung der Meßmethode für die Untersuchung der Wechselwirkung von tRNA mit Ribosomen wurde erstmals gezeigt.

7. Literaturverzeichnis

1. Parker, C.A., Photoluminescence of Solutions, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam (1968)
2. Tao, T. und Cantor, Ch.R. in: Procedures in Nucleic Acid Research (Hrsg. Cantoni, G.L. und Davies, D.R.) Harper and Row, Publisher, New York, Bd. 2 (1971)
3. Weber, G., Biochem. J. 51 (1952) 145
4. Pesce, A.J., Rosen, C.G. und Pasby, T.L., Fluorescence Spectroscopy, Marcel Dekker, New York (1971)
5. Hélène, C., Brun, F. und Yaniv, M., J. Mol. Biol. 58 (1971) 349
6. Rigler, R., Cronvall, E., Ehrenburg, M., Pachmann, U., Hirsch, R. und Zachau, H.G., FEBS Lett. 18 (1971) 193
7. Krauss, G., Römer, R., Riesner, D. und Maass, G., FEBS Lett. 30 (1973) 6
8. Maelicke, A., Engel, G., Cramer, F. und Staehelin, M., Eur. J. Biochem. 42 (1974) 311
9. Pachmann, U., Cronvall, E., Rigler, R., Hirsch, R., Wintermeyer, W. und Zachau, H.G., Eur. J. Biochem. 39 (1973) 265
10. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G., FEBS Lett. 18 (1971) 214
11. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G., Manuskript in Vorbereitung
12. Wintermeyer, W. und Zachau, H.G., in: Methods in Enzymology (Hrsg. Grossman, L. und Moldave, K.) Academic Press New York, (1974) S. 667
13. Förster, Th., Fluoreszenz organischer Verbindungen, Vanden-hoek und Rupprecht, Göttingen (1951)
14. Einstein, A., Ann. d. Physik 17 (1905) 549
15. Perrin, F., J. Phys. Rad. 7 (1926) 390
16. Perrin, F., Ann. de Phys. (Paris) 12 (1929) 169
17. Perrin, F., J. Phys. Rad. 7, Bd. 5 (1934) 497
18. Memming, R., Z. f. Phys. Chem. Bd. 28 (1961) 168

19. Czerlinski, G., Rev. Sci. Instr. 33 (1962) 184
20. Rigler, R., Rabl, C.R. und Jovin, Th.M., Rev. Sci. Instr. 45 (1974) 580
21. Riesner, D. und Römer, R., in: Physico-chemical Properties of Nucleic Acids (Hrsg. Duchesne, J.) Academic Press, New York, Bd. 2 (1973) S. 237
22. Scatchard, G., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660
23. Tissières, A., Watson, J.D., Schlessinger, D., und Hollingworth, B.R., J. Mol. Biol. 1 (1959) 221
24. Letendee, C., Michelson, A.M. und Grunberg-Manago, M., Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 (1966), 442
25. Nirenberg, M.V. und Leder, P., Science 145 (1964) 1399
26. Levin, J.G. und Nirenberg, M.V., J. Mol. Biol. 34 (1968) 467
27. Takeda, Y., Suzuka, I. und Kaji, A., J. Biol. Chem. 243 (1968) 1075
28. Nirenberg, M.V., in: Methods in Enzymology, Bd. 6 (Hrsg. Colowick, S.P. und Kaplan, N.O.), Academic Press New York (1963), S. 17

Abkürzungsverzeichnis

A_{260}	Extinktion bei 260 nm und 1 cm Lichtweg
EB	Ethidiumbromid
E. coli B	Bakterium Escherichia Coli, Stamm B
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
tRNA ^{Phe}	Phenylalanin-Spezifische Transfer-Ribonucleinsäure aus Hefe
tRNA ^{Phe} _{EB 37}	tRNA ^{Phe} , bei der die Base Y (Position 37) in der Anticodon-Schleife durch Ethidium ersetzt ist
tRNA ^{Phe} _{EB 16/17}	tRNA ^{Phe} , bei der Dihydrouracil (Position 16 und 17) durch Ethidium ersetzt ist
tRNA ^{Phe} _{EB 37 red}	mit NaBH ₄ reduzierte tRNA ^{Phe} _{EB 37}
Poly U	Polyuridylsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Lebenslauf

Ich wurde am 13. Februar 1948 als Sohn des Chemikers Dr.-Ing. Siegfried Kahan und seiner Ehefrau, der Chemikerin Ingeborg Kahan, geb. Appel, in Berlin-Tempelhof geboren.

Meine Schulzeit in Kassel ab Ostern 1954 beendete ich mit dem Abschluß des Abiturs im November 1966 am Gymnasium Goetheschule. Im Wintersemester 1966/67 begann ich das Physikstudium an der Technischen Universität Berlin und legte dort im Oktober 1968 die Diplom-Vorprüfung ab. Zum Sommersemester 1969 wechselte ich nach München über, wo ich zunächst an der Technischen Universität und ab Wintersemester 1969/70 an der Ludwig-Maximilians-Universität weiterstudierte. Als Fulbright-Stipendiat war ich von September 1970 bis Juni 1971 an der Brown University in Providence, Rhode Island, USA und beendete dort mein Studium mit dem Master of Science in Physics.

Während meines Aufenthaltes in USA erhielt ich Anregungen, meine Kenntnisse in Physik zur Lösung medizinischer Probleme anzuwenden, und nahm daher im Wintersemester 1971/72 das Medizinstudium an der Universität München auf. Die Naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im Wintersemester 1971/72, die Ärztliche Vorprüfung im Wintersemester 1972/73 ab.

Vom März bis zum Dezember 1974 arbeitete ich an der vorliegenden Dissertation.

Die Ärztliche Prüfung legte ich im Sommersemester 1976 ab.

